

中国桔小实蝇种群的微卫星多态性分析

李伟丰^{1,2}, 杨 朗³, 唐 侃⁴, 曾 玲¹, 梁广文^{1,*}

(1. 华南农业大学昆虫生态研究室, 广州 510642; 2. 广西出入境检验检疫局, 南宁 530028;

3. 广西农业科学院植保所, 南宁 530007; 4. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004)

摘要: 为了研究桔小实蝇种群的遗传结构, 本文采用微卫星分子标记技术, 对中国南方 9 省区、越南和泰国的 11 个桔小实蝇地理种群共 224 个个体的遗传多样性水平及种群遗传结构进行了研究。用 9 对微卫星引物共检测到 48 个等位基因, 平均每个微卫星位点的等位基因数为 5.33 个。GENEPOP 分析结果表明: 11 个桔小实蝇种群在 9 个微卫星位点上的多态位点百分率平均为 94.45%。种群的 Nei's 基因多样性指数平均为 0.4371, Shannon 信息指数平均为 0.7870, 表明桔小实蝇种群具有非常丰富的遗传多样性。Nei's 遗传多样性分析发现, 各地理种群间产生了一定程度的遗传分化, 种群间平均遗传分化系数 $F_{st} = 0.2370$ 。种群间一定程度的遗传分化可能是由地理隔离和基因流障碍($N_{em} = 0.8049$)所引起。UPGMA 聚类分析可知, 中国的桔小实蝇地理种群可分为华南支和西南支两大分支, 华南分支包括福建、台湾、广东和海南 4 个种群, 西南分支包括四川、云南、广西、贵州和湖南 5 个种群。由此推测, 中国桔小实蝇种群结构的形成与演变是在地理演化与经贸交流加强这两种因素的影响下不断进行的动态过程。

关键词: 桔小实蝇; 地理种群; 微卫星; 遗传多态性; 演化

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)12-1255-08

Microsatellite polymorphism of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) populations in China

LI Wei-Feng^{1,2}, YANG Lang³, TANG Kan⁴, ZENG Ling¹, LIANG Guang-Wen^{1,*} (1. Laboratory of Insect Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangxi Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Nanning 530028, China; 3. Plant Protection Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 30007, China; 4. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China)

Abstract: The genetic diversity of 11 *Bactrocera dorsalis* (Hendel) populations consisting of 224 individuals collected from 9 provinces of South China, Vietnam and Thailand was investigated using simple sequence repeat (SSR) markers to study the genetic differentiation among populations. Total 48 alleles at nine loci were amplified, with average of 5.33 alleles each locus. A relatively high level of genetic diversity was revealed: $P = 94.45\%$, Nei's $s = 0.4371$, $I = 0.7870$. A higher level of genetic differentiation was detected among populations with Nei's F -statistics, $F_{st} = 0.2370$. The differentiation in certain degree may result from geographical isolation and barriers to gene flow. UPGMA cluster analysis indicated that the 9 populations from China clustered in two clades, the Southern China clade and the South-western China clade. Populations from Fujian, Taiwan, Guangdong and Hainan gathered into the Southern China clade, while populations from Sichuan, Yunnan, Gaungxi, Guizhou and Hunan formed the South-western China clade. It was so inferred that the evolutionary processes of the populations of the Oriental fruit fly in China are influenced by two factors, i.e., geographical divergence and gene flow by trade communication.

Key words: *Bactrocera dorsalis*; geographical population; microsatellite; polymorphism; evolution

基金项目: 国家科技支撑计划子课题(2006BAD08A14); 国家质量监督检验检疫总局科研项目(2006IK223); 广东省重大科技专项(2004A20401002)

作者简介: 李伟丰, 男, 1971 年生, 博士, 主要从事昆虫分子遗传进化方面的研究, E-mail: lwfcq@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: gwliang@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2007-02-29, 接受日期 Accepted: 2007-11-13

桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*(Hende1),又名东方果实蝇,隶属双翅目(Diptera),实蝇科(Tephritidae),寡鬃实蝇亚科(Dacinae),果实蝇属 *Bactrocera* Macquart. 该虫原产于亚洲热带和亚热带地区,印度早有发现(Bezzi ,1916),1945 年传入夏威夷群岛,迄今已广泛分布亚洲及环太平洋的多数国家和地区(Drew and Hancock ,1994). 我国于 1911 年在台湾首次发现该虫(李文蓉 ,1988),1937 年谢蕴贞报导大陆有该虫记录(谢蕴贞 ,1937),国内该虫现主要分布于广东、广西、湖南、贵州、福建、海南、云南、四川、台湾等省区(梁光红和陈家骅 ,2003). 桔小实蝇寄主范围广,可危害柑橘、番石榴、杨桃、芒果、香蕉、茄子、辣椒、瓜类等 40 多科 250 多种水果和蔬菜,被许多国家列为重要的检疫性害虫(Southwood and Comins ,1976 ,黄素青和韩日畴 ,2005).

早期对桔小实蝇的研究,内容主要涉及形态分类、生物学、生态学和防治等方面(Hardy ,1969 ; Bateman ,1972 ; Fletcher ,1987 ; Drew and Hancock ,1994). 但是有关桔小实蝇种群分子生物学的报道在国内外都较少,目前仅有 He 和 Haymer (1997)运用 PCR 和 EPIC (exon-primed intron-crossing)技术,对夏威夷和泰国的桔小实蝇种群个体的肌动蛋白基因内含子序列直接测序,后用限制酶切技术不同种群的所有的不同等位基因进行了识别研究,施伟和叶辉(2004)通过对 mtDNA COI 基因部分序列的测序和

分析,初步探讨了云南桔小实蝇 5 个地理种群间的遗传关系。

微卫星分子技术因具有分布广泛、多态信息含量高、共显性遗传及检测方便快捷等特点而倍受青睐。Dai 等(2004)开发了 6 个桔小实蝇微卫星位点,并对来自台湾 6 个地方的桔小实蝇种群进行了分析。康芬芬和李志红等(2006)运用微卫星分子标记技术,用 6 对微卫星引物对采自我国福建、广东、云南 3 个地区及邻国越南桔小实蝇种群间的遗传关系进行了初步分析。

本文旨在借助微卫星标记的分析,研究桔小实蝇种群遗传结构,并在此基础上,进一步探讨其起源地、遗传进化及扩散路线等问题。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实蝇标本主要来源于作者近几年收集的口岸进境水果中检疫截获的桔小实蝇标本和各省出入境检验检疫局用实蝇引诱剂诱测的桔小实蝇标本,越南和泰国的标本为国外同行赠送标本(表 1)。所有实蝇成虫标本用体视显微镜鉴定,以确定种类。除部分标本为干标本外,其余的标本均用无水酒精浸泡并保存于 4℃ 冰箱。

表 1 桔小实蝇地理种群标本采集信息

Table 1 Collection data of populations of the Oriental fruit fly <i>Bactrocera dorsalis</i> in this study						
编号 No.	地区 Region	采集地 Location	地理位置 Geographical coordinates	试虫数量 Number of flies tested	采集时间 Collection date	保存方法 Preservation methods
1	广西 Guangxi	南宁 Nanning	22°81 'N 108°34 'E	40	2004.9	95%乙醇 Ethanol
2	广东 Guangdong	广州 Guangzhou	23°15 'N 113°37 'E	44	2004.9	95%乙醇 Ethanol
3	福建 Fujian	厦门 Xiamen	24°48 'N 118°11 'E	24	2004.10	95%乙醇 Ethanol
4	台湾 Taiwan	厦门口岸进境水果截获 Found in the fruits fromTaiwan	24°17 'N 120°67 'E	8	2005.8	干标本 Dry material
5	海南 Hainan	儋州 Danzhou	19°52 'N 109°57 'E	20	2005.6	95%乙醇 Ethanol
6	云南 Yunnan	勐腊 Mengla	21°48 'N 101°57 'E	48	2003.8	95%乙醇 Ethanol
7	四川 Sichuan	攀枝花 Panzhihua	26°57 'N 101°73 'E	18	2004.9	干标本 Dry material
8	湖南 Hunan	长沙 Changsha	28°17 'N 112°94 'E	4	2005.7	95%乙醇 Ethanol
9	贵州 Guizhou	贵阳 Guiyang	26°53 'N 106°70 'E	8	2005.8	95%乙醇 Ethanol
10	越南 Vietnam	河内 Ha Noi	21°08 'N 105°41 'E	10	2004.6	95%乙醇 Ethanol
11	泰国 Thailand	曼谷 Bangkok	13°42 'N 100°34 'E	20	2004.8	95%乙醇 Ethanol

1.2 基因组 DNA 提取

本研究采用德国 QIAGEN 公司的 Dneasy Tissue Kit 昆虫基因组 DNA 提取试剂盒,按照 QIAGEN 公司的 DNA 纯化试剂盒提取步骤提取桔小实蝇样本的 DNA, -20℃ 保存备用。

1.3 引物筛选与 PCR 扩增

本研究用于扩增的 SSR 引物碱基序列参照 Baliraine 等(2003), Augustinos 等(2002)和 Wang 等(2003)发表的在地中海实蝇、油橄榄实蝇和昆士兰实蝇种群研究中应用的 SSR 引物序列,引物由上海申速生物技术有限公司合成。经过筛选,选取了 9

对扩增条带清晰、重复性好的引物用于所有 11 个种群样本分析。

PCR 扩增反应体积为 25 μ L,含 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTPs(上海生工公司),0.1 μ mol/L 每一引物 20 ng 基因组 DNA ,TaqDNA 聚合酶 1 U(Takara 公司)。DNA 扩增采用 Biometra UNII96 型 PCR 仪。PCR 反应程序为:95℃预变性 5 min ,94℃变性 50 s ~ 1 min ,52℃退火 45 s ~ 1 min ,72℃延伸 40 s ~ 1 min ,35 ~ 40 个循环 ;最后 72℃ 7 ~ 10 min 终止反应。每次反应均设不含模板 DNA 的空白对照。

1.4 产物检测

PCR 扩增产物在 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳缓冲液用 1.0 \times TBE ,电泳结束后用银染法显色 ,最后凝胶扫描成像 ,记录结果。

1.5 数据统计分析

按照电泳图谱中同一位置上 DNA 带进行统计 ,记录清晰、稳定出现且产物长度在 80 ~ 300 bp 范围内的扩增带 根据分子量大小对扩增结果读带 ,以二倍体形式记录 ,从大到小依次记作 A ,B ,C ,...。应

用 GENEPOP 软件(侯鑫等 ,2000)在假定种群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下 ,对全部种群和各单个种群分别进行遗传参数分析 ,分别计算多态位点百分率(P)、观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、基因多样性指数($Nei's$)、Shannon 信息指数(I)、表观杂合度 H_o 和预期杂合度 H_e 、种群内近交系数 F_{IS} 、总近交系数 F_{IT} 、种群间分化系数 F_{ST} 、 $Nei's$ (1978)遗传距离(D)和遗传相似度(I)。种群间的基因流通过公式 $N_{em} = (1 - F_{ST})/4F_{ST}$ 间接推算。根据 $Nei's$ 遗传距离 ,利用 NTSYS-PC2.1 (Rohlf ,2000)软件对种群进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果

2.1 微卫星引物在桔小实蝇种群中的扩增结果

本实验中应用筛选的 9 对引物对全部 11 个桔小实蝇种群样本进行了 PCR 扩增。经检验 ,9 对微卫星引物扩增产物明显 ,部分的扩增结果见图 1 ,扩增的微卫星引物信息见表 2。

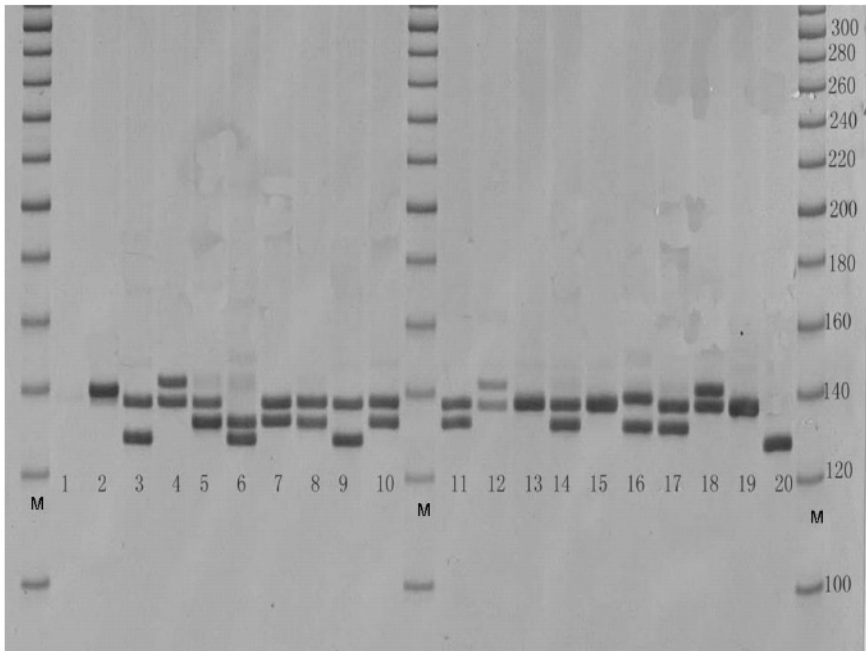


图 1 SSR 引物 6.8A 对部分广东(广州)的桔小实蝇样品的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis image of SSR-PCR amplifications of part samples of *Bactrocera dorsalis* from Guangdong (Guangzhou) with SSR primer 6.8A
1 - 20 : 样品 Samples ; M : DNA 梯度 DNA ladder.

2.2 桔小实蝇地理种群的遗传多样性

9 对微卫星引物在 11 个桔小实蝇种群中共检测到 48 个等位基因 ,在 9 对微卫星扩增位点中 ,每个位点在这 11 个桔小实蝇种群中都有扩增条带 ,没

有出现零等位基因的情况。在 4.6A 位点拥有最多的等位基因为 8 个 ;在 7.2B 位点的等位基因最少 ,仅为 3 个 ;平均每个微卫星位点的等位基因数为 5.33 个。这表明 桔小实蝇种内多数位点的等位基

因分布丰富,除在 Ccmic32 位点和 7.2B 位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡外,绝大多数位点的基因型频率(等位基因表观杂合度)均符合 Hardy-Weinberg 平衡(预期杂合度),在 4.6A 位点的 N_m 值最高为 1.5566,这与该位点拥有最多的等位基因分布相一致。

表 2 微卫星位点引物序列

Table 2 Primer sequences of microsatellite loci						
位点 Locus	重复类型 Repeat motif	引物序列 Forward (F) and reverse (R) primer	产物长度 Product size (bp)	N_A	H_o	H_E
Ccmic32/U81508	(TTG) ₄ (GTG) ₄ (ATG) ₃	F ACCACCCAATAACITCATA R GCTTTCATCATCCGTTCC	184	6	0.3607	0.6862
Bo-D48/AF467828	(CA) ₃	F GCCATGAATGCAGACCAC R TATTCAAATGCACGCCAAAAAC	152	7	0.5328	0.6655
3.2B	(GTT) ₃ GCT(GTT) ₂ (TA) ₃ (GAGT) ₄ (GT) ₃	F ACACGAGCACTTGTTGCAC R AGGCAATATTTCCACCACAC	169	4	0.1393	0.2729
4.3A	(TTG) ₃ TGG(TTG) ₃	F TATGCTGCGTCGCTTATACC R AAGTGCTTTAACTGCGTTCCG	94	4	0.4262	0.6384
4.6A	(GT) ₃	F CATGCATGTGACAAGGAGA R ATGTACAGCCGAGGTAAATG	137	8	0.6967	0.7996
5.8A	(TG) ₃	F CGACGTATGATTTC AATTGC R CTTACTGCAATTCCCACTTC	133	4	0.3852	0.4652
6.8A	(CAT) ₃	F AGCAACACTATAGGCTGGTC R GTAACGCGTTACTGTCAATTG	147	8	0.4590	0.8121
1.6A	(GT) ₀	F TGCATGCTCTCGTTCTAAGGC R AAGTGTTTGCGATAGCACAG	137	4	0.2787	0.3662
7.2B	(CA) ₃ CG(CA) ₃	F CGATCCAATTTCGGAATAAC R CAATTGCCAGCAATAAGTGG	147	3	0.2131	0.5117

N_A : 等位基因数 Observed number of alleles; H_o : 表观杂合度 Observed heterozygosity; H_e : 预期杂合度 Expected heterozygosity.

11 个地理种群的表现杂合度 H_o 在 0.1389 ~ 0.5000 之间,预期杂合度 H_e 在 0.1706 ~ 0.5598 之间,种群水平上的多态位点百分率在 33.33% ~ 100.00% 之间,平均为 94.45%,最高的是广西、广东、福建、海南、云南、四川种群,最低的是越南种群。种群的 Nei 's 基因多样性指数在 0.1493 ~ 0.5458 之间,平均为 0.4371;Shannon 信息指数在 0.2130 ~ 1.0345 之间,平均为 0.7870(表 3)。

表 3 11 个桔小实蝇地理种群在 9 个微卫星位点上的遗传变异参数

Table 3 Summary of genetic variability of 11 populations of <i>Bactrocera dorsalis</i> at 9 microsatellite loci							
种群 Population	N_a	N_e	I	Nei 's	H_o	H_e	P (%)
广西 Guangxi	4.3333	2.6135	1.0345	0.5458	0.4278	0.5598	100
广东 Guangdong	4.2222	2.5283	0.9867	0.5243	0.3687	0.5365	100
福建 Fujian	3.3333	2.4781	0.9223	0.5127	0.4074	0.5350	100
台湾 Taiwan	3.4444	2.3549	0.8765	0.4750	0.4444	0.5000	88.89
海南 Hainan	3.5556	2.3283	0.8961	0.4917	0.5000	0.5175	100
云南 Yunnan	4.4444	2.5706	0.9916	0.5069	0.3519	0.5177	100
四川 Sichuan	3.0000	1.9382	0.7183	0.4040	0.2840	0.4277	100
湖南 Hunan	2.1111	1.8222	0.5965	0.3750	0.4444	0.5000	77.78
贵州 Guizhou	2.7778	2.1993	0.7505	0.4236	0.4722	0.4841	77.78
越南 Vietnam	1.3333	1.2758	0.2130	0.1493	0.1389	0.1706	33.33
泰国 Thailand	2.5556	1.8818	0.6715	0.4000	0.4000	0.4444	88.89
平均值 Mean	3.1919	2.1810	0.7870	0.4371	0.3854	0.4721	87.88

N_a : 观测等位基因数 Observed number of alleles; N_e : 有效等位基因数 Effective number of alleles [Kimura and Crow (1964)]; I : Shannon 's 信息指数 Shannon 's information index [Lewontin (1972)]; Nei 's: 基因多样性 Nei 's gene diversity; H_o : 表观杂合度 Observed heterozygosity, H_e : 预期杂合度 Expected heterozygosity; P : 多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci.

2.3 桔小实蝇地理种群的遗传分化

通过每个位点的固定指数 F_{IT} , F_{IS} , F_{ST} 检验种群的遗传分化。11 个桔小实蝇地理种群在 9 个微卫星位点的 F -statistics 分析结果见表 4。对于整个桔小实蝇地理种群而言,种群间的分化系数 F_{ST} 从位点 4.6A 的 0.1384 到位点 3.2B 的 0.533,种群间平均遗传分化系数 $F_{ST} = 0.2370$,位点 3.2B 显著地

贡献于这一结果。方差分析显示, F_{ST} 在各基因位点上差异极显著。从 F_{ST} 可知,桔小实蝇种群 76.3% 的遗传分化存在于地理种群内,地理种群间的遗传变异约为 23.7%。在种群的水平上,根据公式 $N_{em} = (1 - F_{ST})/4F_{ST}$ 计算种群间的基因流 N_{em} 范围从位点 3.2B 的 0.2190 到位点 4.6A 的 1.5564,种群间平均的基因流 $N_{em} = 0.8049$ (表 4)。

表 4 各位点 F 统计量

Table 4 Summary of F -statistics at 9 loci				
位点 Locus	种群内的近交系数 F_{IT}	总近交系数 F_{IS}	种群间分化系数 F_{ST}	N_{em}
Cemic32	0.1750	0.3630	0.2278	0.8475
Bo-D48	-0.0449	0.2042	0.2384	0.7987
3.2B	0.1338	0.5955	0.5330	0.2190
4.3A	0.1334	0.3657	0.2681	0.6825
4.6A	0.0618	0.1917	0.1384	1.5564
5.8A	-0.0508	0.1902	0.2294	0.8398
6.8A	0.2083	0.3983	0.2400	0.7917
1.6A	0.1505	0.3023	0.1787	1.1490
7.2B	0.3071	0.4797	0.2491	0.7536
Mean	0.1169	0.3263	0.2370	0.8049

根据 Nei's 遗传距离(D)和遗传相似度(I)可以分析不同地理种群间遗传关系的亲疏。从表 5 可以看出,本研究中的 11 个地理种群的遗传相似度范围在 0.4711 ~ 0.9397 之间,其中,中国广西、广东、福建、海南、云南、四川、湖南、贵州和台湾的地理种群间的 $I \geq 0.6$,表明中国的桔小实蝇地理种群相互之间存在着较为频繁的基因交流,而这些中国的桔小实蝇种群与越南和泰国种群的遗传相似度范围在 0.4711 ~ 0.7997 之间,表明虽然这些种群些的基因交流强度在中等强度以上,但相对国内的种群间的基因交流强度还是稍有降低。同时遗传距离(D)也显示,越南桔小实蝇地理种群与国内各省的桔小实蝇地理种群间的遗传距离范围在 0.3563 ~ 0.7527 之间,泰国桔小实蝇地理种群与国内各省的桔小实蝇地理种群间的遗传距离范围在 0.2235 ~ 0.5543 之间,均相对高于国内各省的桔小实蝇地理种群间的遗传距离。

2.4 聚类分析

用 NTSYS-pc 2.1 对 11 个种群的 Nei's 遗传距离(D)进行 UPGMA 聚类分析的结果见图 2。从图中可以看出,云南种群和四川种群的遗传距离最近,首先聚在一起,然后与广西种群聚为一支,湖南种群和贵州种群聚为一支,以上两支最后聚为一支,形成在地理分布上位于西南地区的一支;而海南、台湾、福建和广东聚为一支,形成在地理分布上位于华南地区的一支,这些中国的桔小实蝇地理种

群最后均聚为一支。而越南的桔小实蝇地理种群与其他各种群的遗传距离均较大,最后才与泰国和中国的桔小实蝇地理种群聚类。为研究距离对桔小实蝇遗传结构的影响,我们对各地理种群间的地理距离和遗传距离进行了 Mantel 检验,结果表明,地理种群间的地理距离和遗传距离之间没有显著相关性($r = 0.1840$, $P = 0.2616$)。

3 讨论

3.1 桔小实蝇种群的遗传多样性分析

一般而言,广布种比狭域分布的物种具有更高的遗传多样性(Hamrick *et al.*, 1991)。桔小实蝇现在已经广泛分布于东南亚各国和我国南方大部分省区。由 Botstein 等首先提出的多态位点百分率(P)是衡量遗传多样性的较好的指标,当 $P > 50\%$ 时为高度多态位点, $25\% < P \leq 50\%$ 时为中度多态位点;而当 $P \leq 0.25$ 时为低度多态位点(Botstein *et al.*, 1980)。在本研究中,11 个桔小实蝇种群在 9 个微卫星位点上的多态位点百分率平均为 94.45%。这 9 个微卫星标记均具有高度多态性,可作为有效的遗传标记用于桔小实蝇地理种群遗传多样性和系统发生关系的分析,也表明桔小实蝇种群具有非常丰富的遗传多样性。

杂合度指样本中两个等位基因不相同的概率,预期杂合度主要是根据种群内当前优势等位基因的

表 5 桔小实蝇 11 个种群中 Nei's 遗传相似度 (I) 和遗传距离 (D)

种群 Population	广西 Guangxi	广东 Guangdong	福建 Fujian	台湾 Taiwan	海南 Hainan	云南 Yunnan	四川 Sichuan	湖南 Hunan	贵州 Guizhou	越南 Vietnam	泰国 Thailand
广西 Guangxi	* * * *	0.8801	0.8215	0.8370	0.9002	0.9397	0.8596	0.8132	0.8429	0.6138	0.7997
广东 Guangdong	0.1278	* * * *	0.8885	0.9007	0.8442	0.7900	0.6922	0.6678	0.7814	0.6239	0.7545
福建 Fujian	0.1967	0.1182	* * * *	0.9170	0.9113	0.7944	0.6454	0.7121	0.7860	0.5980	0.7978
台湾 Taiwan	0.1780	0.1045	0.0866	* * * *	0.0845	0.1906	0.3255	0.2485	0.1686	0.4432	0.2037
海南 Hainan	0.1051	0.1694	0.0929	0.9189	* * * *	0.8883	0.7729	0.8168	0.8912	0.7003	0.7850
云南 Yunnan	0.0622	0.2357	0.2302	0.8264	0.1184	* * * *	0.9526	0.8934	0.9172	0.5703	0.6987
四川 Sichuan	0.1513	0.3679	0.4379	0.7222	0.2576	0.0485	* * * *	0.8251	0.8220	0.4711	0.6473
湖南 Hunan	0.2068	0.4037	0.3395	0.7800	0.2024	0.1127	0.1922	* * * *	0.8934	0.5360	0.5747
贵州 Guizhou	0.1709	0.2467	0.2409	0.8448	0.1151	0.0864	0.1960	0.1127	* * * *	0.6675	0.5745
越南 Vietnam	0.4881	0.4717	0.5141	0.6420	0.3563	0.5617	0.7527	0.6236	0.4042	* * * *	0.5833
泰国 Thailand	0.2235	0.2817	0.2259	0.8157	0.2420	0.3585	0.4349	0.5539	0.5543	0.5391	* * * *

表中对角线以上为遗传相似度 , 对角线以下为遗传距离。Nei ' s genetic identity above diagonal and genetic distance below diagonal .

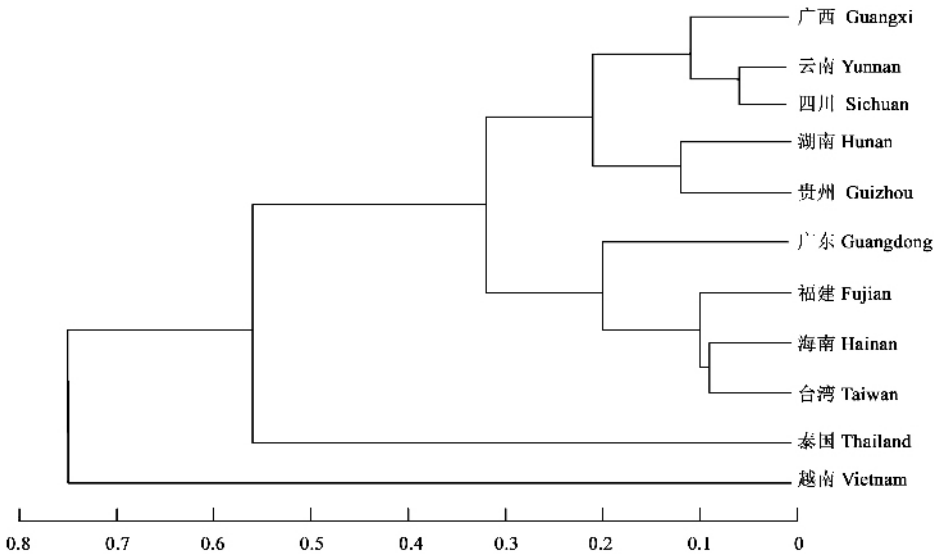


图 2 桔小实蝇地理种群间 Nei ' s 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram for 11 populations of *Bactrocera dorsalis* based on Nei ' s genetic distance

基因频率来推算的 , 闫路娜和张德兴 (2004) 及包文斌等 (2007) 的研究表明 , 样本量与所检测出的微卫星位点有效等位基因数呈正相关 , 而与预期杂合度不相关。群内或种群间的平均杂合体的比例可以衡量种群间遗传分化程度。种群杂合度的高低反应了群体的遗传一致性程度 , 种群杂合度越低 , 表明该种群的遗传一致性越高 , 而种群遗传变异越低 , 种群遗传多样性越低。11 个地理种群的预期杂合度 H_e 在 0.1706 和 0.5598 之间 , 平均为 0.4721。海南和广西的桔小实蝇种群相对其他地区的桔小实蝇的预期杂合度较高 , 表明这两个地区的桔小实蝇地理种群的遗传变异程度要高一些 , 遗传多样性相对更丰富。Kinnear 和 Bariana (1998) 对澳大利亚昆士兰实蝇 *Bactrocera tryoni* 16 个微卫星位点的研究结果为 $H_o = 0.38$; Bonizzoni 和 Malacrida (2000) 用 43 个微卫星

DNA 标记对地中海实蝇的 6 个自然种群的研究结果为 $H_o = 0.28 \sim 0.48$; Nardi 和 Carapell (2005) 用 12 个微卫星对油橄榄实蝇的研究结果为 $H_o = 0.376$ 。本研究所用 11 个桔小实蝇地理种群的遗传变异总体上与昆士兰实蝇、地中海实蝇和油橄榄实蝇的研究结果相似 , 说明在桔小实蝇的 11 个种群内和种群间都存在较高水平的遗传变异 , 遗传多样性也十分丰富。

3.2 桔小实蝇地理种群的遗传分化与基因流

遗传分化的产生原因是多方面的 , 诸如有性生殖、体细胞突变、选择、基因流、遗传漂变及环境的影响。Slatkin 提出用迁移个体数 N_{em} 来表示不同地理种群间的基因流 (gene flow) , 当 $N_{em} < 1$ 时 , 基因流就不足以抵制种群内因遗传漂变而引起的种群分化 (Slatkin , 1985)。施伟和叶辉 (2004) 用线粒体细胞色

素氧化酶 I (CO I) 基因对云南省瑞丽、景洪、勐海、元江、河口的桔小实蝇地理种群进行了部分序列测定, 5 个地理种群间的 N_{em} 值在 3.88 ~ 13.25 之间, 表明这 5 个地理种群间已存有一定程度的遗传分化, 但分化的程度还比较低。研究通过运用微卫星对 11 个桔小实蝇的地理种群进行分析, 种群间的基因流为 $N_{em} = 0.8049 < 1$, 说明这 11 个桔小实蝇种群之间已存在不足以抵制种群内因遗传漂变而引起的一定程度的种群分化, 这与种群分布地区特有的地理特征和气候类型有一定关系。桔小实蝇种群分布地区间的大山大河和海峡从客观上构成了桔小实蝇种群远距离迁飞难以逾越的地理屏障, 正是这些地理屏障, 使不同地区种群相互之间进行基因交流的机会减少, 遗传分化也随之逐渐产生, 因此推测地理隔离是导致桔小实蝇种群遗传分化的根本原因, 这与施伟和叶辉(2004)及康芬芬和李志红(2006)的研究结论一致。

3.3 桔小实蝇地理种群进化关系分析

种群间遗传变异通常由以等位基因频率为基础的遗传距离来表示, 通过遗传距离分析可估测种群间的进化关系。关于计算遗传距离的公式非常多, 目前应用较多的遗传距离指标是 Nei 在 20 世纪 70 年代提出来的(Nei and Li, 1979), 本研究根据 Nei 's 遗传距离和等位基因频率构建的种群 UPGMA 聚类分析结果(图 2)表明: 中国的桔小实蝇地理种群分为华南支和西南支两大分支, 西南地区的四川、云南和广西 3 个种群先聚在一起, 最后又与贵州和湖南的 2 个种群形成一支; 华南的福建、台湾、广东和海南 4 个种群聚在一起形成一支。康芬芬和李志红(2006)用 6 对微卫星引物对采自我国福建、广东、云南 3 个地区及邻近国越南桔小实蝇种群的聚类结果表明, 福建和广东的桔小实蝇的遗传关系很近, 该结果与本研究结果相吻合。这两大分支又与泰国的桔小实蝇种群合为一支, 而越南的桔小实蝇种群单独成为一支并处于整个分支的外围。尽管越南河内与中国广西、云南的距离比泰国与中国广西、云南的距离近, 但很明显越南的桔小实蝇种群与其他种群的遗传距离较大, 与其他种群的遗传分化程度也较高, 这极有可能是由于泰国与中国的水果贸易频繁造成的桔小实蝇种群间基因交流频繁形成的。

迄今为止, 国内外研究者对我国桔小实蝇种群的起源和进化机制的研究才刚刚起步。叶辉(内部资料)运用分子生物学技术研究了云南桔小实蝇的 mtDNA CO II 基因, 发现 CO II 的单倍型数量大大高

于预期, 推断云南的桔小实蝇种群有可能是当地种类, 或者经历了多次入侵。作者研究发现, 中国的桔小实蝇地理种群在国内的分布呈现两大分支的格局, 说明中国的桔小实蝇最早的传入途径有可能存在两个, 即中国桔小实蝇是分别从西南地区和华南地区传入的。西南的一支可能从南亚或东南亚传入到云南, 一部分沿金沙江河谷向北进入四川攀枝花地区, 一部分进入云南后向东部的贵州、广西和华南地区扩散。华南的一支有可能是起源于东南亚的热带地区, 这一支随水果贸易进入中国的东南沿海地区, 逐步向北扩散。但由于我国与东南亚国家历史上具有的长期而频繁的水果贸易对桔小实蝇的传入也会有一定影响, 使得中国的桔小实蝇种群结构不能简单的以桔小实蝇的自然扩散传播来解释其种群的演化, 因此推断中国桔小实蝇种群的具体分化时间和演化过程, 还有待进一步研究。

鉴于以上分析, 我们认为中国的桔小实蝇种群结构的形成与演变是在地理演化与经贸交流这两种因素的影响下不断进行的动态过程。有必要对我国桔小实蝇的种群进一步运用其他分子生物学技术(比如线粒体 DNA, SNP, cSNP)进行系统研究, 然后结合微卫星标记技术综合分析, 提出更为可靠和确切的结论。

致谢 感谢中国科学院动物研究所汪兴鉴研究员对本文提出修改意见。

参 考 文 献 (References)

- Augustinos AA, Stratikopoulos EE, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD, 2002. Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Molecular Ecology Notes*, 2: 278 – 280.
- Baliraine FN, Bonizzoni M, Osir EO, 2003. Comparative analysis of microsatellite loci in four fruit fly species of the genus *Ceratitis* (Diptera: Tephritidae). *Bull. Entomol. Res.*, 93: 1 – 10.
- Bao WB, SHU JT, Xu SH, Li HF, Chen GH, 2007. Effects of sample size and sex ratio on various genetic diversity measures with microsatellite markers. *Chinese Journal of Animal Science*, 43(1): 6 – 9 [包文斌, 束婧婷, 许盛海, 李慧芳, 陈国宏, 2007. 样本量和性比对微卫星分析中群体遗传多样性指标的影响. 中国畜牧杂志, 43(1): 6 – 9]
- Bateman MA, 1972. The ecology of fruit flies. *Annu. Rev. Entomol.*, 17: 493 – 518.
- Bezzi M, 1916. On the fruit flies of the genus *Dacus* (s. l.) occurring in India, Burma and Ceylon. *Bull. Entomol. Res.*, 7: 99 – 121.
- Bonizzoni M, Malacrida AR, 2000. Microsatellite polymorphism in the Mediterranean fruitfly *Ceratitis capitata*. *Insect Molecular Biology*, 9: 251 – 261.

- Botstein D , White RL , Skolnick M , Davis RW , 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* , 32 : 314 – 331 .
- Dai SM , LIN CC , Hang C , 2004. Polymorphic microsatellite DNA markers from the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendl). *Molecular Ecology Notes* , 4 : 629 – 631 .
- Drew RAI , Hancock DL , 1994. The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera : Tephritidae : Dacinae) in Asia. *Bull. Entomol. Res.* , 2 (Suppl.) : i – iii , 1 – 68 .
- Fletcher BS , 1987. The biology of daeine fruitflies. *J. Annu. Rev. Entomol.* , 32 : 115 – 144 .
- Hamrick JL , Godt MJW , Murawski DA , Loveless MD , 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity : implications for conservation biology. In : Falk DA , Holsinger KE eds. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York : Oxford University Press. 75 – 86 .
- He M , Haymer DS , 1997. Polymorphic intron sequences detected within and between populations of the oriental fruit fly (Diptera : Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* , 90 : 825 – 831 .
- Hardy DE , 1969. Taxonomy and distribution of the oriental fruit fly and related species (Tephritidae – Diptera). *Proc. Hawaii. Entomol. Soc.* , 20 : 395 – 428 .
- Hou X , Qiao CL , Liu JE , 2000. A useful population genetics software package – GENEPOP (Version 3.1) . *Biodiversity Science* , 8 : 238 – 240 . [侯鑫 , 乔传令 , 刘俊娥 , 2000. 一个实用的群体遗传学分析软件包——GENEPOP3.1 版. *生物多样性* , 8 : 238 – 240]
- Huang SQ , Han RC , 2005. Advance in the research on the quarantine pest *Bactrocera dorsalis*. *Chinese Bulletin of Entomology* , 42 : 479 – 484 . [黄素青 , 韩日畴 , 2005. 桔小实蝇的研究进展. *昆虫知识* , 42 : 479 – 484]
- Kang FF , Li ZH , 2006. Microsatellite markers for genetic polymorphism in four geographic populations of the oriental fruit fly , *Bactrocera dorsalis* . *Chinese Bulletin of Entomology* , 43 : 371 – 373 . [康芬芬 , 李志红 , 2006. 利用微卫星标记初步分析桔小实蝇 4 个地理种群的遗传多态性. *昆虫知识* , 43 : 371 – 373]
- Kinnear MW , Bariana HS , 1998. Polymorphic microsatellite markers for population analysis of a tephritid pest species , *Bactrocera tryoni* . *Molecular Ecology* , 7 : 1 489 – 1 495 .
- Li WR , 1988. The control programme of the oriental fruit fly in Taiwan. *Chin. J. Entomol. Special Publ.* , 2 : 51 – 60 . [李文蓉 , 1988. 东方果实蝇之防治. *中华昆虫特刊* , 2 : 51 – 60]
- Liang GH , Chen JH , 2003. Advances in research of *Bactrocera dorsalis* (Hendl) in China. *Entomological Journal of East China* , 12 : 90 – 98 . [梁光红 , 陈家骅 , 2003. 桔小实蝇国内研究概况. *华东昆虫学报* , 12 : 90 – 98]
- Nardi F , Carapelli A , 2005. Population structure and colonization history of the olive fly , *Bactrocera oleae* (Diptera , Tephritidae). *Molecular Ecology* , 14 : 2 729 – 2 738 .
- Nei M , 1978. Estination of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* , 89 : 583 – 590 .
- Nei M , Li WH , 1979. Mathematical model for studing genetic variation in terms of restriction endonnuclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 76 : 5 269 – 5 280 .
- Rohlf FJ , 2000. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multi-variate Analysis System , Version 2.1. Exeter Software , Setauket , New York .
- Shi W , Ye H , 2004. Genetic differentiation in five geographic populations of the oriental fruit fly , *Bactrocera dorsalis* (Hendl) (Diptera : Tephritidae) in Yunnan Province. *Acta Entomol. Sin.* , 47 : 384 – 388 . [施伟 , 叶辉 , 2004. 云南桔小实蝇五个地理种群的遗传分化研究. *昆虫学报* , 47 : 384 – 388]
- Slatkin M , 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* , 16 : 393 – 430 .
- Southwood TRE , Comins HN , 1976. A synoptic population model. *Journal of Animal Ecology* , 45 : 949 .
- Wang Y , Yu H , Raphael K , Gilchrist AS , 2003. Genetic delineation of sibling species of the pest fruit fly *Bactocera* (Diptera : Tephritidae) in Australia using microsatellites. *Bulletin of Entomological Research* , 93 : 351 – 360 .
- Xie YZ , 1937. Study on the Trypetidae or fruit-flies of China. *Sinenia* , 2 : 103 – 226 .
- Yan LN , Zhang DX , 2004. Effects of sample size on various genetic diversity measures in population genetic study with microsatellite DNA markers. *Acta Zoologica Sinica* , 50(2) : 279 – 290 . [闫路娜 , 张德兴 , 2004. 种群微卫星 DNA 分析中样本量对各种遗传多样性度量指标的影响. *动物学报* , 50(2) : 279 – 290]

(责任编辑 : 袁德成)